

**Stable biosensor production, comprises coating a redox mediator layer with an adhesive hydrogel gelled at low temperature**

**Patent number:** DE19957826  
**Publication date:** 2001-06-21  
**Inventor:** STREHLITZ BEATE (DE); BOEHLAND CAROLA (DE)  
**Applicant:** UFZ LEIPZIGHALLE GMBH (DE)  
**Classification:**  
- **international:** G01N27/327  
- **european:** C12Q1/00B4  
**Application number:** DE19991057826 19991125  
**Priority number(s):** DE19991057826 19991125

**Report a data error here**

**Abstract of DE19957826**

Producing a biosensor, comprising depositing a redox mediator on the working electrode of a sensor and coating the redox mediator with an adhesive hydrogel by contacting the sensor with an aqueous solution of the hydrogel at 2 deg C or less, keeping the sensor at -5 to 0 deg C for 20-40 minutes, and gelling the solution at 4 deg C.

---

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

D5



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ Patentschrift  
⑩ DE 199 57 826 C 1

⑤1 Int. Cl.<sup>7</sup>:  
G 01 N 27/327

⑦1 Aktenzeichen: 199 57 826.5-52  
⑦2 Anmeldetag: 25. 11. 1999  
④3 Offenlegungstag: -  
④5 Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 21. 6. 2001

DE 199 57 826 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦3 Patentinhaber:  
UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle  
GmbH, 04318 Leipzig, DE  
  
⑦4 Vertreter:  
Patentanwälte Gulde Hengelhaupt Ziebig, 10117  
Berlin

⑦2 Erfinder:  
Strehlitz, Beate, Dr., 04277 Leipzig, DE; Böhland,  
Carola, 06688 Wengelsdorf, DE  
  
⑤6 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
gezogene Druckschriften:  
DE 196 22 458 C2  
DE 44 19 024 C1  
DE 198 17 180 A1  
DE 196 02 078 A1  
DD 2 85 834 A5  
US 53 82 346 A  
WO 95 03 543 A1

⑤4 Verfahren zur Herstellung eines stabilen redoxmediatormodifizierten Biosensors

⑤7 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines redoxmediatormodifizierten Biosensors, wobei sich ein Redoxmediator auf der Arbeitselektrode des Sensormaterials befindet. Erfindungsgemäß wird über dem Redoxmediator eine Schicht eines selbsthaftenden Hydrogels aufgebracht, indem der Sensor mit der wässrigen Lösung des Gels bei Temperaturen bis zu maximal 2°C in Kontakt gebracht wird und dann bei -5°C bis 0°C kurzzeitig gelagert wird sowie anschließend bis zur Gelierung weiter bei ca. +4°C gelagert wird.

199 57 826 C 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines stabilen redoxmediatormodifizierten Biosensors, wobei sich ein Redoxmediator auf der Arbeitselektrode des Sensormaterials befindet. Erfindungsgemäß wird über dem Redoxmediator eine Schicht eines selbsthaftenden Hydrogels aufgebracht, indem der Sensor mit der wässrigen Lösung des Gels bei Temperaturen bis zu maximal 2°C in Kontakt gebracht wird und dann bei -5°C bis 0°C kurzzeitig gelagert wird sowie anschließend bis zur Gelierung weiter bei ca. +4°C gelagert wird.

Biosensoren sind bekanntermaßen eine Kopplung biologischer Komponenten zur spezifischen Erkennung eines Analyten mit einem physikalischen Transduktor. Die Auswahl des Transduktors wird von der biochemischen Reaktion der Biokomponente bestimmt. Am effektivsten sind amperometrische Elektroden. Voraussetzung für die Funktion von Biosensoren ist der direkte Kontakt einer Biokomponente mit dem physikalischen Transduktor durch Immobilisierung der biologisch aktiven Reagentien. Zu ihrer Immobilisierung sind zahlreiche Methoden bekannt, die auf Adsorption, Einschluss z. B. in Hydrogele wie Gelatine oder Kreuzvernetzung in/mit einer Matrix wie Polyacrylamid oder Rinderserumalbumin beruhen.

Reale Proben müssen für eine Messung mit Biosensoren jedoch verdünnt werden, wenn die zu messende Konzentration außerhalb des linearen Messbereichs der Elektrode liegt. Sind mehrere Verdünnungsschritte nötig, steigt der Fehler der Messung. Um diesen linearen Messbereich eines Sensors zu erhöhen, kann eine diffusionslimitierende Schicht auf der Elektrode angeordnet werden.

Man bedient sich sogenannter Mediatoren, die als niedermolekulare Redoxüberträger den Elektronentransfer zwischen dem Enzym bzw. der enzymatischen Reaktion und der Elektrode vermitteln.

Zur Herstellung mediatormodifizierter Biosensoren muss zunächst der Redoxmediator so mit der Elektrode in Kontakt gebracht werden, dass er den gewünschten Elektronentransport zur Elektrodenoberfläche effizient durchführen kann und gleichzeitig aber stabil auf der Elektrode bleibt, ohne sich bei langen Funktionszeiten allmählich von der Elektrode zu entfernen.

Es sind verschiedene Verfahren zur Mediatoraufbringung bekannt, so z. B. durch Adsorption, kovalente Bindung und Inkorporation in das Elektrodenmaterial. Als besonders effektiv hat sich die Inkorporation erwiesen. So ist aus DD 285 834 A1 ein Verfahren bekannt, nach welchem der Mediator durch Anionenaustausch in eine wasserunlösliche Form überführt und dann in das Elektrodenmaterial inkorporiert wird. Das Problem dabei ist, dass der Elektronentransfer von der Diffusionsfähigkeit des Mediators zwischen Elektrode und Enzym abhängig ist. D. h. der Mediator muss noch immer eine gewisse Wasserlöslichkeit aufweisen, um genügend diffusionsfähig für den Elektronentransfer zu sein, aber er darf gleichzeitig nicht von der Elektrodenoberfläche wegdiffundieren. Das bedeutet, dass der Sensor zwar eine relativ gute Stabilität hat, wenn der Mediator relativ fest in das Material eingebunden ist, die Sensoren jedoch dann eine geringe Sensitivität aufweisen. Durch eine nicht so starke Bindung des Mediators erreicht man Sensoren mit höherer Sensitivität. Diese sind aber wiederum wesentlich weniger stabil.

Es sind elektrochemische Verfahren zur kontrollierten Mediatorabscheidung in Kombination mit einem Polymer beschrieben, wobei das Polymer z. B. Polyanilin sein kann

tential wird in einem bestimmten Potentialbereich geändert (zyklische Voltametrie) oder es wird sprunghaft von einem Potential zum anderen geändert (Potential-Puls-Verfahren). Diese Mediator-Polymerfilme weisen zwar eine recht gute Stabilität auf, ihre Haftfähigkeit auf der Elektrodenoberfläche ist jedoch begrenzt.

Aufgabe der Erfindung war es deshalb, ein Verfahren zur Herstellung von redoxmediatormodifizierten Biosensoren bereitzustellen, die langzeitstabil, hoch sensitiv und auch zur Messung höherer Analytkonzentrationen geeignet sind.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch das Einschließen des Redoxmediators in die Schicht eines selbsthaftenden Hydrogels gelöst. Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung eines redoxmediatormodifizierten Biosensors ist dadurch gekennzeichnet, dass über dem Redoxmediator eine Schicht eines selbsthaftenden Hydrogels aufgebracht wird, indem der Sensor mit der wässrigen Lösung des Gels bei Temperaturen bis zu maximal 2°C in Kontakt gebracht wird und dann bei -5°C bis 0°C kurzzeitig gelagert wird, bevorzugt für 20 bis 40 Minuten, insbesondere bevorzugt für 30 Minuten. Anschließend wird der Biosensor weiter bis zur Gelierung bei ca. +4°C gelagert. Die Gelierung tritt je nach verwendetem Gel nach ca. 20 bis 28 Stunden ein.

Es wurden dadurch Strukturen an der Elektrodenoberfläche ausgebildet, die einerseits eine effektive Rückhaltung des Redoxmediators gewährleisten und andererseits eine Diffusionslimitierung des Analyten darstellen.

Die biologischen Reagentien für den Biosensor, vorzugsweise Enzyme, Antikörper, Mikroorganismen, DNA/RNA bzw. deren Fragmente, werden mit dem Redoxmediator auf der Elektrode plaziert. In einer anderen Variante werden sie zusammen mit dem Hydrogel aufgebracht, indem die wässrige Gellösung die biologischen Reagentien enthält.

Die wässrige Hydrogelschicht wird vorzugsweise bei einem pH-Wert von 5,5 bis 7,5 aufgebracht und deckt die Elektrode an allen Rändern sicher ab.

Da die Gelierung des Hydrogels bei niedrigen Temperaturen unerwartet so abläuft, dass eine dichtere Struktur ausgebildet wird, wird das erfindungsgemäße Verfahren zum Aufbringen des Hydrogels bei Temperaturen von ca. 2°C durchgeführt. Überraschend ist, dass bei der Verarbeitung und Aufbringung des Hydrogels bei den niedrigen Temperaturen eine besonders feine Struktur erreicht wird, die eine verbesserte Rückhaltung des Mediators bewirkt.

In einer Ausführungsvariante hat sich sogar gezeigt, dass die Umsetzung erfolgreich durchgeführt werden kann, wenn die Sensoren bei -5 bis -7°C z. B. auf Kühlakkus vorgekühlt werden und auch bei diesen Temperaturen bearbeitet werden.

Als besonders geeignet hat sich für das erfindungsgemäße Verfahren das Hydrogel Poly(carbamoylsulfonat)hydrogel (PCS) erwiesen. Aber auch andere Gele, wie z. B. Polyacrylamid, Calciumalginat oder Chitosan-Gel sind erfindungsgemäß einsetzbar.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können alle bekannten Redoxmediatoren stabil auf der Elektrode gehalten werden. Folgende Redoxmediatoren kommen für das Verfahren bevorzugt in Frage:

Triarylmethan-Farbstoffe, wie z. B. Kresolrot, p-Xenolblau, Bromphenolblau, Thymolblau, Bromchlorphenol, Pararosanilin, Bromphenolrot, Bromkresolpurpur, Kristallviolett, Methylthymolblau, Bromthymolblau, m-Kresolpurpur, Bromkresolgrün, Anilinblau, Methylgrün, Methylblau, Fuchsin, Neufuchsin, Xylenorange, Chlorphenolrot, Brillantgrün Patentblau

Phenazine, wie z. B. Neutralrot, Safranin T, Phenosafranin, Janusgrün B, Phenaziniummethosulfat (PMS), 1-Methoxy-PMS;

Phenothiazine, wie z. B. Neumethylenblau, Azur A, Azur B, Azur II, Toluidinblau O, Methylenblau, Thionin, Nilblau, Acridinorange;

Phenoxazine, wie z. B. Gallocyanin, und Indigosulfonate, wie z. B. Indigocarmin, Indigotrisulfonat.

In einer bevorzugten Ausführungsvariante erfolgt das Aufbringen des Redoxmediators durch elektrochemische Polymerisation, wobei der Redoxmediator, ggf. in Kombination mit dem biologischen Reagenz, aus einer wässrigen oder organischen Lösung bzw. einem Gemisch beider polymerisiert wird. Aber auch andere Methoden der Mediatoraufbringung können erfolgreich angewandt werden.

Der erfindungsgemäß hergestellte Biosensor ist langzeitstabil und kann bei Temperaturen von 4°C über einen Zeitraum von mehr als 6 Monaten gelagert werden ohne an Sensitivität zu verlieren.

Darüber hinaus weisen die erfindungsgemäßen redoxmediatormodifizierten Biosensoren eine Vergrößerung des Messbereichs auf. So erfassen z. B. bekannte Biosensoren für die Phenolbestimmung einen Bereich bis 10 µM. Ein erfindungsgemäß hergestellter Biosensor ermöglicht den Bereich auf das 10-fache zu erweitern und Messungen bis 100 µM werden durchführbar.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein redoxmediatormodifizierter Biosensor. Dieser Biosensor umfaßt eine Arbeitselektrode, auf der sich eine Redoxmediatorschicht und darüber eine selbsthaftende Hydrogelschicht befindet.

In einer bevorzugten Ausführungsvariante sind in der Hydrogelschicht biologische Reagentien, vorzugsweise mindestens ein Enzym, vorhanden.

Ein besonders bevorzugter Biosensor ist in der Fig. 1 dargestellt, die die Schichten auf der Arbeitselektrode zeigt.

#### Legende zu Fig. 1

- 1 Sensorbasismaterial
- 2 Arbeitselektrode mit Leiterbahn
- 3 Isolierschicht
- 4 Redoxpolymerschicht
- 5 PCS-Gelschicht bzw. Enzymimmobilisatschicht

Anschließend wird die Erfindung am Beispiel eines Phenolsensors auf der Basis des Enzyms Tyrosinase und des Redoxmediators Phenaziniummethosulfat (PMS) näher erläutert, auf den sie sich jedoch nicht beschränkt.

#### Beispiel

Das Polymer von PMS wird elektrochemisch auf der Kohlenstoff-Arbeitselektrode eines dickschichtmodifizierten Sensors aus der 1 mM Lösung des Monomers in 0,25 M Phosphatpufferlösung pH 6,86 abgeschieden. Dazu wird die Methode der zyklischen Voltametrie mit den Bedingungen: Potentialbereich -400 mV ... +100 mV, scan rate 50 mV/s, 100 scans verwendet. Als Gegenelektrode dient eine Pt-Elektrode, die Referenzelektrode ist eine Ag/AgCl-Elektrode. Der Sensor wird zur Aufbringung der Enzym-Immobilisatschicht für 30 min auf 0°C vorgekühlt. Die für die Herstellung der Immobilisatschicht erforderlichen Lösungen werden im Kühlschrank auf 2°C vorgekühlt, 1 mg Tyrosinase wird in 12 µl Phosphatpufferlösung pH 6,8 gelöst und mit 12,5 µl PCS-Präpolymer vermischt. Der pH-Wert wird auf 7,0 eingestellt. 0,1 µl werden auf die Arbeitselektrode

lagert. Der Sensor ist zur Messung von Phenolen geeignet.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines stabilen redoxmediatormodifizierten Biosensors durch Aufbringen des Redoxmediators auf die auf dem Sensormaterial befindliche Arbeitselektrode, wobei über dem Redoxmediator eine Schicht eines selbsthaftenden Hydrogels aufgebracht wird, indem der Sensor mit der wässrigen Lösung des Gels bei Temperaturen bis zu maximal 2°C in Kontakt gebracht wird und dann bei -5°C bis 0°C kurzzeitig für 20 bis 40 Minuten gelagert wird sowie anschließend bei ca. +4°C weiter bis zur Gelierung gelagert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die kurzzeitige Lagerung für 30 Minuten erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass als selbsthaftendes Hydrogel Poly(carbamoylsulfonat) hydrogel (PCS) verwendet wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die wässrige Gellösung auf einen pH-Wert von 5,5 bis 7,5 eingestellt wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die wässrige Gellösung biologische Reagentien enthält.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Redoxmediator Phenaziniummethosulfat oder 1-Methoxy-Phenaziniummethosulfat ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Redoxmediator elektrochemisch polymerisiert wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Redoxmediator in Kombination mit mindestens einem biologischen Reagenz polymerisiert wird.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

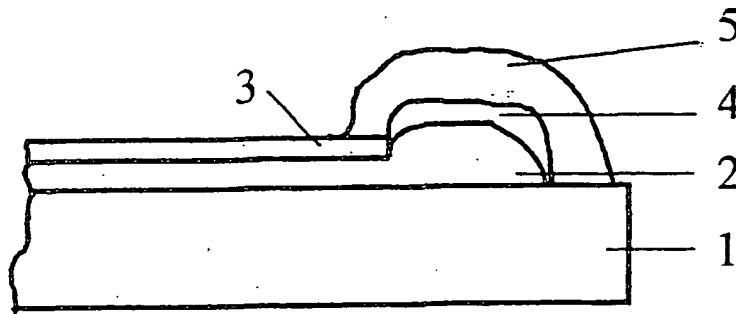


Fig. 1